

S11 1 PN=JP 1156658  
? t 11/9

11/9/1  
DIALOG(R)File 347:JAPIO  
(c) 1998 JPO & JAPIO. All rts. reserv.

02859058  
BIOSENSOR

PUB. NO.: 01-156658 [JP 1156658 A]  
PUBLISHED: June 20, 1989 (19890620)  
INVENTOR(s): SUETSUGU SACHIKO  
KOBAYASHI SHIGEO  
MORIGAKI KENICHI  
KOMATSU KIYOMI  
NANKAI SHIRO  
KAWAGURI MARIKO  
APPLICANT(s): MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD [000582] (A Japanese Company  
or Corporation), JP (Japan)  
APPL. NO.: 62-316610 [JP 87316610]  
FILED: December 15, 1987 (19871215)  
INTL CLASS: [4] G01N-027/46; G01N-027/30  
JAPIO CLASS: 46.2 (INSTRUMENTATION -- Testing)  
JAPIO KEYWORD: R127 (CHEMISTRY -- Fixed Enzymes)  
JOURNAL: Section: P, Section No. 934, Vol. 13, No. 424, Pg. 114,  
September 21, 1989 (19890921)

ABSTRACT

PURPOSE: To measure a measuring component with good accuracy up to a high-concentration region by installing an immobilized layer of oxidase on an electrode system and bringing a layer which consists of a water soluble mediator deposited in a dry state on a insoluble porous film into tight contact with the surface of said layer.

CONSTITUTION: A measuring electrode 2, a counter electrode 3 and an insulating layer 4 are provided on an insulating substrate 1. An aqueous solution of 5% carboxymethyl cellulose is applied on this electrode system and is dried. Furthermore, a glucose oxidase solution is coated as an enzyme solution thereon and is dried to produce the enzyme immobilized layer 5. The mediator deposited layer 6 produced by impregnating a phosphate buffer solution of potassium ferricyanide as the mediator to a porous cellulose film and drying the same is held in pressurized contact with the surface of the enzyme immobilized layer 5 by a holding frame 7. A large amount of the potassium ferricyanide is thereby supplied into a sample liquid and the migration of the sample reaction liquid between the respective layers is smoothly executed at the time of measurement and, therefore, the objective component is measured with the good accuracy up to the high concentration.

BEST AVAILABLE COPY

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-156658

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>G 01 N 27/46  
27/30

識別記号

庁内整理番号

M-7363-2G  
J-7363-2G

⑭ 公開 平成1年(1989)6月20日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンサ

⑯ 特 願 昭62-316610

⑰ 出 願 昭62(1987)12月15日

⑱ 発 明 者	末 次 佐 知 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	小 林 茂 雄	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	森 垣 健 一	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	小 松 き よ み	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	南 海 史 朗	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑱ 発 明 者	河 栗 真 理 子	大阪府門真市大字門真1006番地	松下電器産業株式会社内
⑲ 出 願 人	松下電器産業株式会社	大阪府門真市大字門真1006番地	
⑳ 代 理 人	弁理士 中尾 敏男	外1名	

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

バイオセンサ

## 2. 特許請求の範囲

(1) 測定極と対極からなる電極系を設け、この電極系上に酸化酵素の固定化層を設置し、さらにその上部にメディエーターが不溶性多孔体膜に乾燥状態で担持された層を密着させた構成であることを特徴とするバイオセンサ。

(2) 前記メディエーターが水溶性メディエーターである特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサ。

## 3. 発明の詳細な説明

## 産業上の利用分野

本発明は、種々の試料中の特定成分を迅速かつ容易に定量することのできるバイオセンサに関するものである。

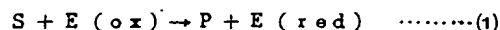
## 従来の技術

近年、酵素反応と電極反応を結びつけて、試料中の特定成分を測定するバイオセンサが利用されるようになってきた。

以下に従来のバイオセンサについて説明する。

第4図は従来のバイオセンサの断面図であり、8は絶縁性基板、9と10は絶縁性基板8上に導電性カーボンペーストをスクリーン印刷して形成した測定極と対極である。11は絶縁層で、絶縁性樹脂ペーストを絶縁性基板8、測定極9、対極10上に前記同様印刷し、電極部とした。12はメディエーターを前記電極部表面に塗布して製作したメディエーター担持層で、13はメディエーター担持層12上に設置された酵素固定化層である。

以上のように構成されたバイオセンサについて以下、その動作を説明する。試料液を上部から滴下すると、まず酵素固定化層13において(1)式に示すように試料液中の特定成分と酸化酵素が特異的に反応する。



S : 特定成分、E(ox) : 酸化型酵素

P : 生成分、E(red) : 還元型酵素

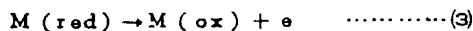
さらにメディエーター担持層12において(2)式に示すようにメディエーターが還元される。



$M(\text{ox})$  : 酸化型メディエーター

$M(\text{red})$  : 還元型メディエーター

ここで生成した還元型メディエーターを電極系 9, 10 上で(3)式に示すように酸化し、

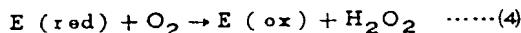


$e$  : 電子

この酸化電流値を測定することにより試料液中の特定成分濃度を検知する。

発明が解決しようとする問題点

しかしながら前記従来の構成では、酸化酵素を使用する場合、メディエーター担持層において前記(2)式に示す反応と、(4)式に示すような試料液中の溶存酸素との競争反応が起こるため、還元型メディエーターの生成が阻害される。



$O_2$  : 酸素、 $H_2O_2$  : 過酸化水酸

特にフェロセン、ベンゾキノンなどの難水溶性のメディエーターを使用する場合、前記(4)式の反応の影響は大きく、高濃度の特定成分に十分対応で

ことがなく、酸化型メディエーターが安定に保持され精度良く測定できる。また、測定の際、上部から試料液を滴下すると、まず水溶性メディエーター担持層を通過し、試料液中に多量のメディエーターが溶解した後、酵素反応が起こるため試料液中の溶存酸素との競争反応の影響が減少し、特定成分が高濃度まで測定可能となり、さらに、各層間の密着性が高い構造であることから、反応液の移動が円滑に起こり、精度良い測定が可能である。

#### 実 施 例

以下本発明の一実施例としてのグルコースセンサについて、図面を参照しながら説明する。

第1図は本発明の一実施例におけるグルコースセンサの断面図を模式的に示すものである。第1図において、1は絶縁性基板、2は測定極、3は対極、4は絶縁層でこれらは従来例の構造と同じものである。5は酵素固定化層で、電極部2, 3, 4上に0.5%カルボキシメチルセルロース水溶液を塗布し45℃30分で恒温乾燥を行い、電極部

素固定化層13を形成する際、酵素を湿式で固定化する間に、酵素とメディエーターの湿潤状態で共存による相互の酸化還元反応が進行し、メディエーターの酸化還元状態が不安定で、精度良い測定ができないという問題点を有していた。

本発明は前記従来の問題点を解決するもので、酸化型メディエーターを多量に供給し、各層間を密着させることにより、特定成分を高濃度域まで精度良く測定できるバイオセンサを提供することを目的とする。

問題点を解決するための手段

この目的を達成するために本発明のバイオセンサは、測定極と対極から成る電極上に酸化酵素の固定化層を設置し、さらにその上部に水溶性メディエーターを不溶性多孔体膜に乾燥状態で担持した層を密着させた構成としたものである。

#### 作 用

この構成によって、バイオセンサ形成過程において酵素とメディエーターが湿潤状態で共存する

と密着性の良い膜厚1μのカルボキシメチルセルロース膜を得、これを担体として、酵素溶液であるグルコースオキシダーゼ溶液を塗布、乾燥しグルコースオキシダーゼを固定化して作製した。

6はメディエーター担持層で、セルロース多孔体膜を担体として、メディエーターであるフェリシアン化カリウムのリン酸塩緩衝液(pH 5.6)中に含浸後乾燥して作製したものである。7は保持枠で酵素固定化層5の上に前記の様に作製したメディエーター担持層6を密着性良く圧着し保持するためのものである。

以上のように構成された本実施例のグルコースセンサについて、以下その動作を説明する。まず試料液を第1図の上部に滴下すると、まずメディエーター担持層6において水溶性のフェリシアン化カリウムが試料液中に溶解し、高濃度のフェリシアン化カリウム溶液が生成される。次に、メディエーター担持層6と密着している酵素固定化層5に速やかに溶液が移動し、酵素固定化層5において、グルコースオキシダーゼとフェリシアン化

カリウムの反応が前記の(1)式、(2)式のように起こり、フェロシアン化カリウムが生成する。そして、酵素固定化層5と密着している電極上でフェロシアン化カリウムの酸化電流値を測定することにより試料中のグルコース濃度を検知する。

第2図は前記のグルコースセンサで測定した酸化電流値とグルコース水溶液のグルコース濃度との関係を示すものである。Aは本発明の電極系上に酵素固定化層を設置した上にメディエーター担持層を密着させて形成したもので、Bは従来例の電極上にメディエーター担持層を設置した上に酵素固定化層を形成したものである。この図より、Aでは電流値とグルコース濃度は500 mg/dlまで非常に良い直線性を示しているが、これに対し従来例のBでは、グルコース濃度が200 mg/dl以上の応答に直線性が見られないことがわかる。これはBの構成では、メディエーターが試料液中に十分存在しないために、メディエーターの還元反応(前記(2)式)の競争反応である溶存酵素の反応(前記(4)式)が優性となり、メディエ

ーターの還元量がグルコース濃度に対応しないためと考えられる。

第3図は前記のグルコースセンサで測定した同一のグルコース水溶液の各グルコースセンサにおける酸化電流値を示すものである。図中Aは前記本発明のグルコースセンサ、Bは前記従来例のグルコースセンサである。この図より、Aは各グルコースセンサ間での電流値のばらつきが小さく安定した測定値を示している。しかし、Bは応答値の平均が高く、各グルコースセンサ間の電流値のばらつきが大きく安定に測定されていないことがわかる。これは、酵素固定化層作製の際の湿潤状態において、メディエーターの還元が起こり、試料液中のグルコース量に依存しない還元メディエーターが生成し、メディエーター担持層内に酸化型と還元型メディエーターが混在するため測定値の平均が大きくなり、ばらつきも増加すると考えられる。

以上のように、本実施例によれば電極系上にグルコースオキシダーゼのような酸化酵素の固定化

層を設置し、さらにその上部に水溶性メディエーターであるフェリシアン化カリウムが不溶性多孔体膜であるセルロース膜に乾燥担持された層を密着させた構成を設けたことにより、試料液中のグルコース量を高濃度まで精度良く測定することができる。これは、測定の際、試料液中にフェリシアン化カリウムが多量に供給され、かつ各層間の試料反応液の移動が円滑に行われているためと考えられる。

なお本実施例では水溶性メディエーターとしてフェリシアン化カリウムを用いたが、他に、アルシアンブルー、ルテニウムレッド、メケレンブルーなどの色素でも良い。

#### 発明の効果

以上のように本発明によれば、測定極と対極からなる電極系上に酸化酵素の固定化層を設置し、さらにその上部に水溶性メディエーターが不溶性多孔体膜に乾燥状態で担持された層を密着させた構成とすることにより、特定成分を高濃度域まで精度良く測定できるという効果が得られる。

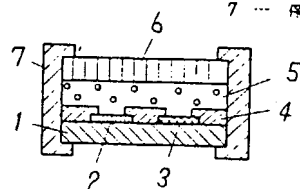
#### 4、図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例におけるグルコースセンサの断面図、第2図はグルコースセンサのグルコース濃度と応答電流の相関特性図、第3図は各グルコースセンサと応答電流の関係図、第4図は従来例におけるバイオセンサの断面図である。

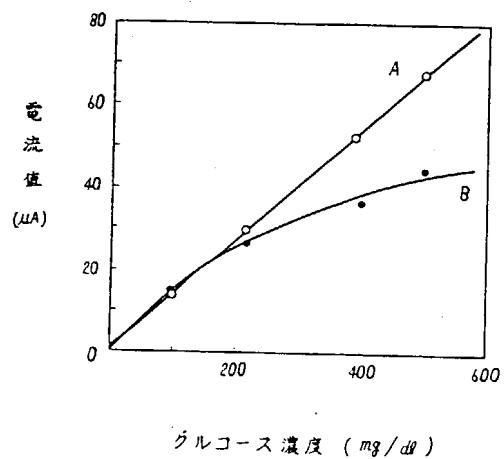
1……絶縁性基板、2……測定極、3……対極、4……絶縁層、5……酵素固定化層、6……メディエーター担持層、7……保持枠。

代理人の氏名 弁理士 中 尾 敏 男 ほか1名

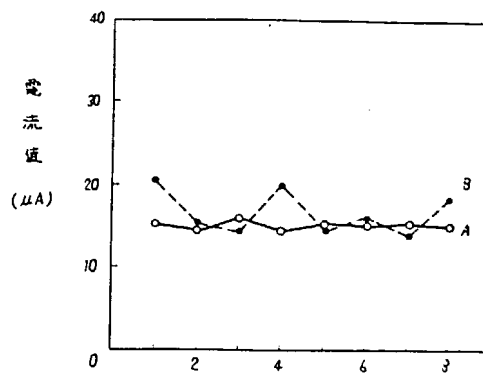
第 1 図



第 2 図

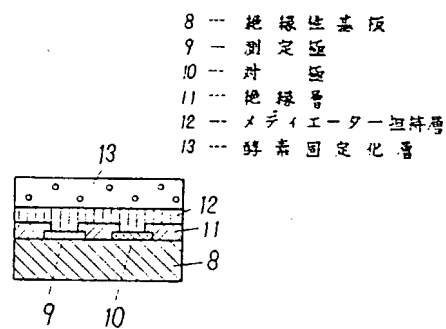


第 3 図



グルコースセンサ NO.

第 4 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image  
problems checked, please do not report these problems to  
the IFW Image Problem Mailbox.**